

補助事業番号 2021M-229

補助事業名 2021年度 2022年度セラミックス薄膜の高密度積層による生体再生モデルの開発 補助事業

補助事業者名 佐賀大学 青木茂久

## 1 研究の概要

生体再生モデル(Body-on-Sheet)による人工臓器や薬理解析ツールの可能性評価として、以下の検証を行った。各臓器を構成する上皮細胞、線維芽細胞、血管内皮細胞をセラミックス超薄膜上で培養し、細胞シートを作製する。さらに、これらのシートを高密度に積層し、擬似的臓器(Organ-on-Sheets)を構築した。この擬似的臓器を連結することで、生体再生モデル(Body-on-Sheet)を作製し、人工臓器や薬理解析ツールとしての可能性を検証した。

## 2 研究の目的と背景

現在の移植医療において、ドナーは慢性的に不足しており、今後も解消する目処は立っていない。そこで、臓器機能を代替する人工臓器が注目されている。現在、基礎研究で汎用されているOrgan-on-a-Chipは実験室レベルでの解析には有用であるが、人工臓器としての工業化を考慮した場合に、プラスチック系素材の力学的脆弱性から、高い充填効率、耐久性、安定性を十分に満足させることが困難である。一方、セラミックスは近年注目されつつあるバイオマテリアルである。セラミックスは、耐久性に優れ耐熱性も高いものの、素材が大型(厚手)であり、現在その用途は人工骨などに限定されている。申請者は、共立エレックス(株)が製造する膜厚50 μmのセラミックス超薄膜「①薄さ、②高い力学的強度」に着目し、複数の細胞種からなる細胞シートの開発・作製に目途を得た。そこで、超薄膜からなる細胞シートを高密度に積層し、患者の疾患レベルを再現できる擬似的臓器(Organ-on-Sheets)の創出を目指した。

## 3 研究内容

### (1)セラミックス薄膜を利用した積層培養法の開発

(<https://exp-patho.med.saga-u.ac.jp/research.html>)

セラミックス超薄膜を膜同士の間隔を1 mmという近接状態で配列し、かつ培養槽内の通液量を機械的に正確に制御可能な専用培養装置を設計した。複数の試作品を作製し、培養槽の形状改良とポンプの増設を伴う培養装置(ver.3)の最終形状を決定した。

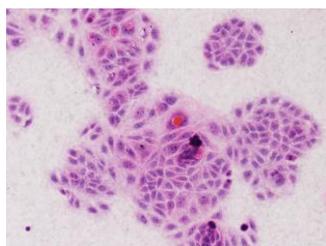
セラミックス超薄膜専用培養装置を用いて、上皮系細胞(重層扁平上皮細胞、子宮内膜細胞、肝細胞)、間葉系細胞(線維芽細胞、血管内皮細胞)、癌細胞(扁平上皮癌、悪性黒色腫)を用いて、セラミックス超薄膜が培養担体として妥当であるか否かを評価した。その結果、いずれの細胞もセラミックス超薄膜上で増殖することを確認した。重要な細胞評価方法のひとつである免疫染色が、セラミックス超薄膜培養でも適応可能か否かを調べるために、子宮内膜細胞(HEC265)をセラミックス超薄膜で1週間培養し、10%中性緩衝ホルマリンで固定した。細胞が固定化されたにセラミックス超薄膜に対して、抗Cytokeratin (CK) AE1/AE3抗体および抗Estrogen receptor抗体を用い

て免疫染色を行った。その結果、通常の病理標本と同様に、セラミックス超薄膜上で培養された細胞は、CK AE1/AE3抗体により中間径フィラメントを有する細胞質に陽性像を示した。さらに核に存在するEstrogen receptorは細胞核で陽性となり、染色性の妥当性が確認できた。

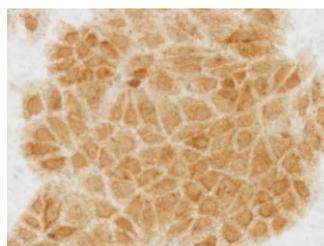
セラミックス超薄膜を用いて、各種細胞シートの作製を行った。また、それらの細胞シートと線維芽細胞シートとの混合培養を1週間行い、それぞれの細胞の細胞形態の評価および増殖能(Ki67陽性率)とアポトーシス(cleaved caspase 3陽性率)を免疫染色により解析した。

皮膚シート(表皮細胞:HaCaT細胞)では、表皮シート単独と比較し線維芽細胞との混合培養において、表皮細胞の特徴であるシート状の形態がより明瞭に観察された。Ki67の陽性率に関して、混合培養は単独培養と比較し高値を示した。cleaved caspase 3の陽性率に関して、混合培養は単独培養と比較し低値であった。

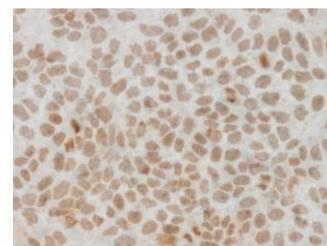
培養装置内に4枚のセラミックス薄膜を設置し、以下の検討を行った。初めに、表皮細胞株であるHaCaT細胞からなる細胞シートのみ4枚(HaCaT単独群)、線維芽細胞であるNIH-3T3細胞からなる細胞シートのみ4枚(NIH-3T3単独群)、HaCaT細胞2枚+NIH-3T3細胞シート2枚(HaCaT+NIH-3T3混合群)を作製し検討した。3日間培養を行い、それぞれの実験群における細胞形態、接着性、増殖性を比較した。HaCaT単独群では、セラミックス薄膜上で、小型の胞巣を形成する増殖像が見られた。細胞形態は胞巣の中心部では敷石状であったが、胞巣辺縁部ではやや紡錐形を示した。NIH-3T3単独群では小型紡錐形細胞がセラミックス薄膜上において、疎に分布していた。HaCaT+NIH-3T3混合群では、HaCaT細胞は単独群と比較し、細胞数の増加が見られた。表皮細胞の代表的形態である細胞間橋構造も明瞭化しており、一部では個細胞角化も見られ、分化度の亢進が確認された。細胞増殖の示標であるKi67に対する免疫染色を行った結果、Ki67の陽性率はHaCaT+NIH-3T3混合群で高く、HaCaT単独群では低値であった。さらに、NIH-3T3細胞は、細胞質の増加、細胞数の増加が見られ、近隣細胞との突起の連携が確認された



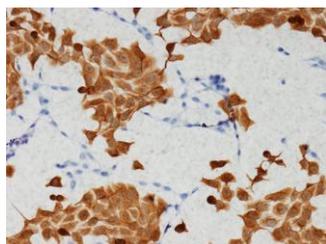
類内膜癌細胞 HE染色



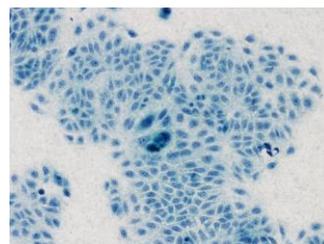
サイトケラチン免疫染色



エストロゲンレセプター免疫染色



表皮細胞と線維芽細胞の共培養サイトケラチン免疫染色



類内膜癌細胞 p16免疫染色

#### 4 本研究が実社会にどう活かされるか—展望

現在の人工臓器開発は主にホローファイバーを用いて開発されている。この場合、細胞の管理が非常に困難である。一方、当培養法はセラミックスを用いた2次元培養であり、細胞の維持、交換が圧倒的に容易である。人工臓器の工業化を目指す上で、このメンテナンスの簡便さは、圧倒的に有利な点となることが予想される。

#### 5 教歴・研究歴の流れにおける今回研究の位置づけ

研究代表者は、現在まで、培養細胞を用いた病態モデルの作製や再生医療用医療機器の開発を実践してきた。本研究で得られた成果は、次世代人工臓器の社会実装を目指す上で、大きな基盤的知見となりうると確信している。

#### 6 本研究にかかわる知財・発表論文等

現時点では知財・発表論文はございません。

#### 7 補助事業に係る成果物

##### (1)補助事業により作成したもの

現時点ではございません。

##### (2)(1)以外で当事業において作成したもの

現時点ではございません。

#### 8 事業内容についての問い合わせ先

所属機関名： 国立大学法人 佐賀大学（コクリツダイガクホウジン サガダイガク）

住 所： 〒840-8502 佐賀市本庄町1

担 当 者： 平山 伸 役職名URA(リサーチ・アドミニストレーター)

担 当 部 署： リージョナル・イノベーションセンター

E - m a i l: [ura-team@mail.admin.saga-u.ac.jp](mailto:ura-team@mail.admin.saga-u.ac.jp)

U R L: <https://www.suric.saga-u.ac.jp/>